



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/66, 7/06, A61K 38/04	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/18239 (43) Date de publication internationale: 22 mai 1997 (22.05.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01812 (22) Date de dépôt international: 15 novembre 1996 (15.11.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/13544 15 novembre 1995 (15.11.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOCIETE D'ETUDE ET DE RECHERCHE DE PATHOLOGIE APPLIQUEE - SERPA [FR/FR]; 18, avenue de l'Europe, Villa Missouri - Tech Village 2, F-31520 Ramonville-Saint-Agne (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DUSSOURD D'HINTERLAND, Lucien [FR/FR]; 10, rue Pierre-Benoît, F-31400 Toulouse (FR). PINEL, Anne-Marie [FR/FR]; 771, rue des Navigateurs, F-34280 La Grande-Motte (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: PEPTIDE CONJUGATES DERIVED FROM THYMIC HORMONES, THEIR USE AS MEDICAMENT AND COMPOSITIONS CONTAINING THEM (54) Titre: CONJUGUES PEPTIDIQUES DERIVES DES HORMONES THYMIQUES, LEUR UTILISATION A TITRE DE MEDICAMENT ET COMPOSITIONS LES CONTENANT (57) Abstract <p>The invention relates to peptide conjugates comprising a sequence of at least 3 amino acids derived from a thymic hormone selected amongst thymuline and thymopoietine, the amino acids being independently in the form D, L or DL, said sequence being chemically or physically conjugated with at least one compound selected amongst monocarboxylic acids having the general formula (I): HOOC-R, as well as alcohol, aldehyde or amide derivatives, the dicarboxylic acids having the general formula (II): HOOC-R₁-COOH. The invention also relates to the use of such conjugates as medicaments, and pharmaceutical or cosmetological compositions containing them.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne des conjugués peptidiques comprenant une séquence d'au moins 3 acides aminés dérivés d'une hormone thymique choisie parmi la thymuline et la thymopœtine, les acides aminés pouvant être indépendamment sous forme D, L ou DL, ladite séquence étant conjuguée chimiquement ou physiquement avec au moins un composé sélectionné parmi: les acides monocarboxyliques de la formule générale (I): HOOC-R, ainsi que les dérivés alcool, aldéhyde ou amide; les acides dicarboxyliques de la formule générale (II): HOOC-R₁-COOH. Elle concerne également leur utilisation à titre de médicament et des compositions pharmaceutiques ou cosmétologiques les contenant.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brsil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

CONJUGUES PEPTIDIQUES DERIVES DES HORMONES THYMIQUES, LEUR UTILISATION A TITRE DE MEDICAMENT ET COMPOSITIONS LES CONTENANT

L'invention se rapporte à de nouveaux dérivés synthétiques de deux hormones thymiques, la thymuline et la thymosine, et à leurs applications, en tant que médicament ou dans le domaine de la cosmétologie.

Les nombreuses études sur le fonctionnement du système immunitaire, ont mis en évidence le rôle capital du thymus et des hormones thymiques, dans la stimulation des défenses immunitaires de l'organisme.

Les hormones thymiques, en particulier la thymuline, "J.F. BACH et coll.", la thymopoïétine "GRANDSTEIN" et la Thymosine "DAYNE" ont été identifiées comme étant de nature polypeptidique et peptidique.

Ces hormones et principalement la thymuline et la thymopoïétine, ont la propriété d'induire la maturation des lymphocytes T et de stimuler la réponse immunitaire de l'organisme.

Il a été démontré scientifiquement qu'il existait une relation étroite entre la diminution des fonctions thymiques avec l'âge, et le vieillissement cutané sur le plan physiologique normal.

Au niveau pathologique, la perte d'activité du thymus, "involution", se traduit par l'apparition de troubles physiologiques : "maladies auto-immunes, alopecies (chute anormale des cheveux) etc...".

Il a également été démontré qu'il existait une relation entre les propriétés physiologiques du thymus et certaines cellules de l'épiderme.

Il existe en effet une similitude de structure entre certaines cellules du thymus et les kératinocytes. Il a été démontré que les kératinocytes sécrètent également, dans certaines conditions, une hormone du type thymopoietine identique à celle sécrétée par le thymus, et sont capables d'induire une maturation lymphocytaire post thymique, et de prendre ainsi le relais du thymus.

Cette relation, entre les activités physiologiques des cellule du thymus et les kératinocytes, a été récemment confirmée par la mise en évidence dans les cellules du thymus, de la présence de kératine et de kératohyaline, de structures identiques à la kératine et à la kératohyaline sécrétée par les kératinocytes de l'épiderme.

Par ailleurs la démonstration apportée sur le plan scientifique, que les kératinocytes en phase de différenciation sécrétaient une substance activant la croissance des thymocytes, l'ETAF confirme les relations physiologiques existant entre le thymus et les kératinocytes. (ETAF :
5 Epidermal Thymocyte Activating Factor).

Il existe un parallèle entre "l'involution" du thymus et la diminution de la synthèse de l'ETAF par les kératinocytes en fonction de l'âge, avec toutefois un décalage fonctionnel en faveur des kératinocytes (maturation lymphocytaire post thymique).

10 L'utilisation des hormones thymiques, en particulier la thymuline et la Thymopoïétine en thérapeutique, a fait l'objet de nombreux travaux pharmacologiques et cliniques, en vue de la stimulation et de la régulation des défenses immunitaires de l'organisme.

Utilisées sous forme d'extraits ou de molécules obtenues par
15 synthèse chimique, ces produits ont donnés des résultats irréguliers et décevants, par suite de leur manque de stabilité, et d'un effet ubiquitaire lié à l'absence de relations doses-effets.

La présente invention a pour objet, l'obtention par synthèse chimique de dérivés peptidiques des hormones thymiques, dont la
20 structure a été orientée de façon à leur assurer une grande stabilité physico-chimique, et une activité pharmacologique parfaitement définie.

Utilisant l'ensemble des connaissances acquises et développées récemment par nos équipes, concernant le rôle primordial de l'épiderme dans les défenses immunitaires et ses relations avec le thymus
25 (International Society of Development and Comparative Immunology), la présente invention a pour objet, la réalisation de dérivés peptidiques de synthèse, dont l'activité physiologique et thérapeutique est orientée vers la stimulation et la modulation des défenses immunitaires du derme et de l'épiderme préférentiellement à toute action systémique.

30

Un des objets péférentiel de l'invention concerne la réalisation par synthèse chimique de métallopeptides dont les propriétés physiologiques sont spécifiquement orientées vers l'activation du système immunitaire cutané, et la stimulation des fonctions germinatives des cellules basales de l'épiderme à l'exclusion de tout effet secondaire sur l'immunité systémique (générale).

La présente invention a pour objet la réalisation de molécules peptidiques, homologues, ou dérivés des séquences peptidiques actives des principales hormones thymiques "la thymuline et la thymopoïétine".

Les nombreux essais cliniques effectués avec ces médiateurs hormonaux n'ont pas permis de mettre en évidence leur intérêt thérapeutique.

En effet, utilisés sous forme de préparations injectables pour le traitement des déficits immunitaires et des affections auto-immunes, les résultats ont tous été négatifs, en raison de leur activité ubiquitaire en fonction des doses administrées.

Il semble que ces effets ubiquitaires soient liés à la structure de ces composés, obtenu par synthèse, qui ne leur permet pas de se fixer normalement sur les globulines et les récepteurs cellulaires, compte tenu de leur administration parentérale.

C'est pourquoi l'un des objets de l'invention est la réalisation de composés sous forme de métallopeptides obtenu par synthèse, dont les activités physiologiques sont orientées vers la modulation du système immunitaire et l'activation des cellules germinatives de l'épiderme, par applications topiques locales, selon le principe pharmacologique des "relations-structures-activités" (Principe de Häch).

Plus particulièrement la présente invention a pour objet une composition pharmaceutique ou cosmétologique contenant au moins un conjugué peptidique comprenant une séquence d'au moins trois acides aminés dérivés de la séquence totale de la thymuline ou de la thymopoïétine, les acides aminés pouvant être sous forme D, L, ou DL, ladite séquence étant conjuguées chimiquement ou physiquement avec au moins un composé sélectionné parmi :

- les acides monocarboxyliques de formule générale



dans laquelle R représente un radical aliphatique en C₁-C₂₀, linéaire ou ramifié, éventuellement substitué, pouvant comporter une ou plusieurs

5 insaturations,

ainsi que les dérivés alcool ou aldéhyde ou amide des acides de formule I ;

- les acides dicarboxyliques de formule générale



dans laquelle R₁ représente un radical aliphatique divalent, comprenant

10 au moins 3 atomes de carbone, de préférence 3 à 10 atomes de carbone, droit ou ramifié, notamment un radical alkyl, alkylène, alkénylène ou alkynylène, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs groupes amino, hydroxy, oxo ou un radical alkyl en C₁-C₃, R₁ pouvant en outre former un

15 cycle avec l'une des fonctions acides.

Les conjugués selon l'invention, sont des dérivés de faible poids moléculaire, qui sont obtenus notamment sous forme de sels, d'esters ou d'amides des composés de formule I ou II.

Parmi les composés de formule I, sont particulièrement préférés des

20 acides carboxyliques, à activité métabolique essentielle du cycle tricarboxylique de Krebs, agissant au niveau des mitochondries, comme coenzyme de décarboxylation oxydative, et dont les propriétés sont de se fixer préférentiellement par covalence sur les fonctions ε aminés de certains peptides, sous forme de lipo-amides, facilitant ainsi la

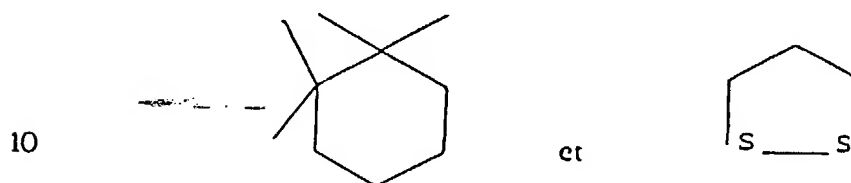
25 présentation des conjugués peptidiques obtenus selon l'invention au récepteur beta de classe G, des cellules de l'épiderme.

Pour ces acides, et d'autres convenant à la mise en oeuvre de l'invention, R peut représenter un radical aliphatique linéaire ou ramifié en C₁-C₂₀, notamment en C₁-C₄, substitué ou non, notamment un radical

30 alkyl, alkényl ou alkynyl, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations et pouvant être substitué par un ou plusieurs radicaux choisis dans le groupe comprenant :

NH₂, OH, oxo, thiol ou un radical cyclique non aromatique comportant de 5 à 6 atomes dans le cycle dont 1 ou 2 pouvant être différents du carbone, en particulier, S, O ou N, lesdits cycles pouvant être substitués par des radicaux alkyl en C₁ à C₃, notamment méthyl.

- 5 En particulier lorsque R représente une chaîne aliphatique en C₁-C₂₀, elle peut être substituée par un cycle choisi parmi



- 15 D'autres composés de formule I adaptés à la mise en oeuvre de l'invention sont ceux pour lesquels, dans la formule générale I, R peut représenter un radical monoinsaturé de configuration cis ou trans, de formule générale



- 20 dans laquelle R₂ peut représenter un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence 6 à 16 atomes de carbone, éventuellement substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo.

De manière avantageuse, dans la formule II, R₁ représente un reste alkylène en C₄-C₈ éventuellement substitué.

- 25 Des conjugués peptidiques selon l'invention sont notamment ceux pour lesquels l'acide de formule générale I est choisi parmi l'acide acétique, l'acide pyroglutamique, l'acide DL lipoïque, l'acide dihydrolipoïque, la N-lipoyl-lysine, les acides hydroxydécénoïques et décénoïques, l'acide rétinoïque et ses dérivés, le rétinol et le rétinol, l'acide myristique et ses dérivés, l'acide palmitique, sous forme de sels, d'esters ou amides, ou bien l'acide de formule générale II est choisi parmi
- 30 l'acide adipique, l'acide α-amino adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et leurs dérivés.

Les acides de formules générales I ou II sont de préférence choisis parmi l'acide acétique et ses dérivés, l'acide pyroglutamique, l'acide α -DL-Lipoïque et ses dérivés, l'acide dihydrolipoïque, la N-Lipoyl-Lysine, l'acide adipique, l'acide α -amino-adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et ses dérivés, l'acide trans-10-hydroxy- Δ^2 -décénoïque et l'acide trans-oxo-9-decène-2-oïque, l'acide rétinoïque et ses dérivés, le rétinol, et le rétinol, l'acide myristique et l'acide palmitique.

La séquence en acides aminés des conjugués selon l'invention contiendra l'une des 3 séquences suivantes :

10 Gln-Gly-Gly
 Arg-Lys-Asp
 Lys-Asp-Val

En effet plus spécifiquement, la présente invention concerne la réalisation de deux séries de molécules peptidiques dont les activités sont complémentaires, au niveau des applications dans les domaines de la médecine humaine et de la dermo-cosmétique.

La présente invention concerne préférentiellement des conjugués peptidiques, dérivés de l'hormone thymique circulante, la thymuline, et dont les activités physiologiques sont orientées vers la maturation du système immunitaire et des différents médiateurs du système immunitaire cutané.

Ces conjugués peptidiques étant particulièrement orientés vers le traitement des maladies auto-immunes de la peau, et en particulier, la prévention et le traitement des alopecies quelles soient d'origine physiologique (vieillesse), traumatiques ou pathologiques.

La présente invention concerne également la réalisation de conjugués peptidiques, dérivés de l'hormone thymique cellulaire, la thymopoïétine, et dont les activités physiologiques sont également orientées vers la maturation du système immunitaire de la peau, tout en possédant une activité préférentielle pour la stimulation des métabolismes, des cellules de l'épiderme, en particulier des kératinocytes germinatifs, dont ils stimulent les sécrétions et les synthèses endocellulaires des molécules de structures "kératines de bas poids moléculaires et kératohyalines".

35

Cette série de conjugués peptidiques étant particulièrement indiquée, vers le traitement des maladies de la peau, liées à des déficits immunitaires, et en particulier, au traitement préventif et curatif, du vieillissement cutané d'ordre physiologique (âge) ou pathologique.

- 5 De préférence la séquence en acides aminés des conjugués peptidiques dérivés de la thymuline répond à la formule générale suivante:



- 10 dans laquelle Gln représente la glutamine ou un dérivé de la glutamine, Gly représente la glycine ou un dérivé de la glycine ; les dérivés comprennent notamment les dérivés halogénés des acides aminés en cause. Les acides aminés peuvent être sous forme naturelle ou non.

Selon l'un des aspects de l'invention, les conjugués peptidiques présenteront donc la formule suivante :

- 15
$$\text{A-X-Gln-Gly-Gly-Y} \quad (\text{III})$$

dans laquelle A est un composé de formule générale I ou II tel que défini précédemment, en particulier l'acide DL lipoïque, l'acide dihydrolipoïque ou la N-lypoyllysine.

- X est : Ser, Lys-Ser, Ala-Lys-Ser, Pyr-Ala-Lys-Ser, une liaison ou
20 Glx-Ala-Lys-Ser

dans laquelle Glx est : Pyro-Glu, Glu ou Gly et ses dérivés

- Y est : Ser-Asn-OH
Ser-Asn-NH₂
25 Ser-OH
Ser-NH₂

Les amino-acides étant sous la forme L, D ou DL

- 30 Dans les formules qui suivent, Pyr représente l'acide pyroglutamique.

De préférence, les conjugués peptidiques de formule III comportent une séquence d'au moins 4 acides aminés, en particulier de 4 à 9 acides aminés, celle-ci comprenant avantageusement la séquence Gln-Gly-Gly-Ser.

5 La présente invention concerne tout particulièrement les conjugués suivants :

- I A - Pyr - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
- II A - Pyr - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
- III A - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
- 10 IV A - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
- V A - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
- VI A - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
- VII A - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
- VIII A - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
- 15 IX A - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
- X A - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
- XI A-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Ser-Asn-OH.

20 A étant défini précédemment ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels, d'esters ou d'amides.

Les séquences d'acides aminés mentionnées ci-dessus, peuvent être des séquences d'acides aminés naturels ou non naturels.

Il est également précisé que les conjugués peptidiques mentionnés ci-dessus et faisant l'objet de la présente invention, peuvent être obtenus
25 sous la forme terminale NH₂ et sous la forme terminale OH.

De même, dans certains cas, il est possible que certains de ces acides aminés comportent des fonctions par exemple des glycosylations.

Selon un autre aspect, l'invention concerne des conjugués peptidiques dérivés de la thymopoiétine et répondant à la formule
30 générale suivante :



dans laquelle A est un composé de formule générale I ou II tel que défini précédemment ou le radical correspondant, et notamment l'acide acétique et ses dérivés, l'acide DL- α -lipoïque et ses dérivés, l'acide dihydrolipoïque, la N-lipoyl-lysine, l'acide adipique, l'acide α -amino-adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et dérivés, l'acide trans-oxo-9-décène-2-oïque, l'acide trans-hydroxy-10-décène-2-oïque

W représente : Glu-Gln-Arg, Gln-Arg, Arg,
Arg-Lys-, Arg-Lys-Asp ou une liaison

Z représente : Val-Tyr-NH₂, Val-Tyr-OH

Val-NH₂, Val-OH, Tyr-OH, Tyr-NH₂,
OH ou NH₂

W et Z étant choisis de telle sorte que l'une au moins des séquences Arg-Lys-Asp ou Lys-Asp-Val est présente dans les composés de formule IV.

Des conjugués peptidiques de formule IV comportant la séquence Arg-Lys-Asp-Val donnent d'excellents résultats.

Les acides aminés peuvent être sous forme D, L ou DL et peuvent être éventuellement glycosylés.

Des conjugués peptidiques particulièrement adaptés, et dont les activités biologiques sont complémentaires des conjugués peptidiques de formule III, sont les conjugués de formule IV suivants :

- | | |
|-------|-----------------------------------------------|
| XI | A-Glu-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH ₂ |
| XII | A-Glu-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH |
| XIII | A-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH ₂ |
| XIV | A-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH |
| XV | A-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH ₂ |
| XVI | A-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH |
| XVII | A-Lys-Asp-Val-Tyr-NH ₂ |
| XVIII | A-Lys-Asp-Val-Tyr-OH |
| XIX | A-Arg-Lys-Asp-Val-NH ₂ |
| XX | A-Arg-Lys-Asp-Val-OH |
| XXI | A-Arg-Lys-Asp-NH ₂ |
| XXII | A-Arg-Lys-Asp-OH |

"A" étant défini précédemment ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels, d'esters, ou d'amides.

Les séquences d'acides-amino mentionnés ci-dessus peuvent être des séquences d'acides-amino naturels ou non naturels.

- 5 Il est précisé que les conjugués peptidiques mentionnés ci-dessus peuvent être obtenus sous la forme terminale NH_2 ou OH .

Les conjugués peptidiques selon l'invention peuvent également se présenter sous forme de complexes moléculaires avec un métal, notamment le zinc.

- 10 Les conjugués selon l'invention pourront être obtenus par synthèse, par des techniques connues de l'homme du métier.

Les synthèses des peptides libres peuvent être effectuées d'après les techniques de MERRIFIELD, selon deux procédés.

- 15 Dans un premier procédé, on utilise un dérivé de la Glutamine protégé dans sa fonction d'amide γ par le "Mbh" 4,4-diméthoxybenzhydryl.

Dans un second procédé, la synthèse est effectuée sans protection de l'amide γ des résidus de la Glutamine.

- 20 En utilisant la première et la seconde procédure, la partie protégée C-terminale du dipeptide est associée respectivement au térapeptide protégé Ser-Gln-Gly et à l'hexapeptide protégé Ala-Lys-Gln-Gly-Gly.

Ainsi, la préparation des polypeptides de séquence

X-Gln-Gly-Gly-Y,

- 25 dans laquelle Y représente Ser-Asn et X représente Ser ou Ala-Lys-Ser, est effectuée en associant le dipeptide protégé Ser-Asn avec le peptide protégé X-Gln-Gly-Gly et par l'élimination consécutive possible des groupes protecteurs.

- 30 En utilisant la seconde procédure, c'est donc l'octapeptide Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn qui est obtenu, alors qu'en utilisant la première procédure, le même octapeptide est préparé à partir de l'hexapeptide Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn en passant par l'heptapeptide Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn.

L'octapeptide Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn permet alors de préparer les deux formes, par association du premier résidu PyroGlu ou Gln.

5 Le processus utilisé pour associer le résidu PyroGlu dans la séquence Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Y est le même quelles que soient les significations possibles de Y, à savoir Ser et Ser-Asn, et les significations possibles qui en sont dérivées par la modification d'un acide aminé, par exemple pour Ser-Asp, Ala-Asn.

10 Cette association est obtenue de manière avantageuse au moyen du dérivé PyroGlu-OTcp dans la séquence Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Y, dans laquelle certains acides aminés ont la possibilité d'être protégés dans leur fonction sur la chaîne latérale.

15 Les dérivés peptidiques faisant l'objet de la présente invention et précédemment décrits, peuvent être utilisés sous leur forme peptidique ou sous forme de conjugués, avec les acides carboxyliques précédemment décrits répondant à la formule générale I.

Ces mêmes conjugués peptidiques peuvent être utilisés sous forme de complexes moléculaires avec un métal.

20 Le métal utilisé pour la réalisation des complexes métallo-peptidiques de la présente invention est par exemple le Zinc, sous forme de $ZnCl_2$ qui peut être couplé sous forme de sel, avec un groupe carboxylique de l'acide amino terminal, ou sous forme de complexes "peptides- Zn^{2+} " dans les proportions suivantes de 0,5 à 5%, de préférence 1% de $ZnCl_2$ par molécule peptidique.

25 Ces proportions sont variables en fonction du poids moléculaire du conjugué peptidique.

Le complexe métallo-peptidique peut notamment être obtenu en solution à 10% de $ZnCl_2$, pour une molécule peptidique, après chauffage à 20° C pendant 10 minutes.

30 Le complexe est ensuite purifié, par exemple sur colonne de biogel P-2, et élué avec de l'eau distillée et lyophilisé.

On obtient un colyophilisat stable contenant 1% de Zinc fixe à la molécule du peptide par affinité.

L'ensemble des composés selon la présente invention peut être utile à titre de médicament.

En particulier, les conjugués selon la présente invention peuvent servir à la préparation d'un médicament destiné à corriger les déficiences du système immunitaire.

Des compositions pharmaceutiques peuvent contenir au moins un conjugué selon l'invention et des excipients adaptés à l'administration par voie parentérale ou par voie topique externe.

Ces compositions sont utilisables aussi bien dans le domaine de la médecine humaine et vétérinaire, administrables par voie orale, ou parentérale, mais de préférence sous forme administrable par voie topique externe.

Des compositions particulièrement adaptées à la mise en oeuvre de l'invention sont celles contenant l'un des conjugués suivants :

. acide acétique-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH₂

. Pyr-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Ser-Asn-OH

éventuellement sous forme de complexe avec un métal.

Les conjugués peptidiques faisant l'objet de l'invention, leurs dérivés et leurs compositions galéniques peuvent être présentés sous forme de crèmes, de laits, de lotions ou de sprays, et comporter des excipients connus et éventuellement d'autres principes actifs.

Ils peuvent être utilisés seuls, ou sous forme d'associations ou de compositions galéniques pour le traitement des maladies auto-immunes dans les différents domaines de la dermatologie.

L'invention concerne également l'utilisation des conjugués peptidiques en dermocosmétologie et en cosmétologie.

La présente invention a donc pour objet des compositions galéniques, pharmaceutiques, et cosmétologiques comprenant au moins un des conjugués peptidiques décrit précédemment.

Les conjugués peptidiques de l'invention, leurs dérivés, leurs associations avec des principes actifs connus, peuvent être utilisés sous forme de préparations cosmétologiques et capillaires, notamment pour le rajeunissement et le renouvellement des couches superficielles de la peau, et en particulier pour le traitement cosméto-capillaire de la chute des cheveux.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention, et notamment l'activité immunostimulante des peptides thymiques de synthèse administrés par voie topique, sans aucunement en limiter la portée.

5 Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

Figure 1 : Action de l'ETF sur la synthèse de DNA.

Figure 2 : Action de l'ETF sur les cellules NK par voie topique (cellules cibles : YAC1). Le pourcentage de lyse est représenté aux jours 1, 3, 6, 9, 15, 18 et 21 de l'injection, pour les différents rapports cellules effectrices/cellules cibles.

Figure 3 : Action d'ETF sur les cellules NK par voie topique (cellules cibles P815).

Figure 4 : Action de l'ETF sur les cellules NK in vitro. Le pourcentage de lyse en fonction du rapport cellules effectrices/cellules cibles est donné pour différentes doses d'ETF.

Figure 5 : Action de l'ETF sur les cellules NK par voie injectable. Le pourcentage de lyse en fonction du rapport cellules effectrices/cellules cibles est représenté après stimulation par 15 µg d'ETF, et pour des animaux témoins.

Figure 6 : Rôle de l'interféron dans la stimulation des cellules NK par ETF par voie injectable. Le pourcentage de lyse est donné en fonction du rapport cellules effectrices/cellules cibles, en présence ou non d'anti-interféron.

Figure 7 : Action de l'ETF sur des cellules NK par voie injectable : cinétique de la réponse 1, 3 et 8 jours après administration de 15 µg ETF par voie intra-péritonéale.

EXEMPLE N° 1 - PREPARATION DU CONJUGUE N° II

30 A-Pyro-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-NH₂

A = acide DL Lipoïque

La synthèse est réalisée selon la méthodologie générale décrite selon les étapes suivantes :

- 1 - Boc-Gln-Gly-Gly-OMe
- 5 2 - Trifluoroacetate-Gln-Gly-Gly-OMe
- 3 - Z-Ser-NH-NH₂(But) -> Bop -> DIEA -> DMF
- 4 - Z-Ser-Glu-Gly-Gly-Ser-NH₂
- 5 - Acide Lipoïque -> BOP -> DIEA -> DMF
- 6 - Lipoyl-Pyro-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-NH₂

10

Analyse HPLC des amino-acides

Asp-1,02 ; Ser-1,77 ; Glu-1,0 ; Gly-2,00 ; Ala-0,91.

EXEMPLE N° 2 - PREPARATION DU CONJUGUE N° III

15

A-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH₂

A = Acide Adipique

La synthèse a été réalisée selon la méthodologie générale selon les étapes suivantes :

20

- 1 - Z-D-Ala-Lys-(Boc)-Ser(But) -> DMF
- 2 - Lys-(Boc)-Ser(But)-Gln(Mbh) -> DMF
- 3 - Gly-Gly-Ser(But)-Asn-O-But
- 4 - Me.OH -> CH₃COOH -> D-Ala-Lys(Boc)-Ser(But)-Gln(Mbh)
- 25 -> Gly-Gly-Ser-Asn(But)
- 5 - Acide Adipique -> BOP -> DIEA
- 6 - Adipoyl-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH₂

Analyse HPLC des amino acides

30 Asp-1,02 ; Ser-1,77 ; Glu-1,0 ; Gly-2,00 ; Ala-0,91.

EXEMPLE N° 3 - PREPARATION DU CONJUGUE N° 1

A-Pyro-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH₂

A = Acide Acétique

- 5 Ce conjugué est obtenu par la méthodologie décrite à l'exemple 1 à partir du dérivé :

Ala-Lys(Boc)-Ser(But-Gln-Mbh)-Gly-Gly-Ser(But)-Asn(But)
décrit précédemment.

- 10 On obtient un produit homogène par chromatographie dans les solvants G et H, à pH 2, 3.

Analyse HPLC des amino acides.

Asp-0,97 ; Ser-1,67 ; Glu-1,84 ; Gly-2,00 ; Ala-0,98.

- 15 **EXEMPLE 4 - MESURE DE L'ACTIVITÉ SUR LES CELLULES DE LANGERHANS IA⁺ ET LES THYMOCYTES THY.1.2⁺ DE L'ÉPIDERME DES SOURIS C57-BL/6**

I **Résumé**

- 20 Les kératinocytes des souris "C57-BL/6" stimulés par les dérivés peptidiques des hormones thymiques libèrent les médiateurs (messagers cellulaires) tels que l'ETAF, l'IL1 et IL6, qui induisent une activation de la réponse immunitaire des cellules immunocompétentes de l'épiderme, les cellules de Langerhans Ia⁺ et les Thymocytes Thy 1.2⁺.

- 25 La mesure de cette activation par les techniques d'immunofluorescence est caractéristique de l'activité immunomodulatrice des peptides thymiques.

I I **Matériel et Méthode**

30

1 - **Echantillons expérimentés - Code : ETF**

En solution dans propylène glycol à (c) = 10⁻⁵ M/ml

ETF - Peptide - n° I
ETF - Peptide - n° III
ETF - Peptide - n° XV
ETF - Peptide - n° XIX

5

témoin = propylène glycol

2 - Méthodologie

10 Des souris mâles C 57 - BL/6 âgées de 5 à 7 semaines, réparties à raison de 4 par cage, avec libre accès à l'eau et à la nourriture soumises à une photopériode de 12 h de lumière par 24 heures, reçoivent quotidiennement et pendant 5 jours consécutifs une application topique du peptide dans du propylène glycol (vol de 50 µl), sur la face dorsale de
15 l'oreille.

Le jour 6, les animaux sont sacrifiés. On procède au prélèvement des oreilles avec séparation de la face dorsale et de la face ventrale.

Les tissus de la face dorsale sont immergés dans de l'EDTA de Na (0,020 M) pendant 2 h à 37° C.

20 Après incubation, l'épiderme est prélevé sous forme de feuillet intact fixé à l'acétone et réhydraté dans du PBS (tampon phosphate).

Les CED (cellules épidermiques dendritiques) Thy 1-2 + et la + sont identifiées par double marquage en immunofluorescence indirecte.

25 Le nombre de cellules par mm² est déterminé par les zones périphériques de même surface, pour chaque feuillet épidermique.

Les CED (cellules épidermiques dendritiques) portant le marqueur la+ ont été identifiées par l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-la+.

30 Les feuillets épidermiques sont fixés à l'acétone, puis incubés pendant 1 h à 37° C en présence de l'anticorps monoclonal anti-la+ et marqués par la méthode de l'immunoperoxydase indirecte (Kit).

Après incubation pendant 10 minutes à 37° C avec une solution d'amino-éthyl-carbazol, la préparation est lavée au PBS.

Les CED Thy 1.2+ ont été identifiées par double marquage en immunofluorescence indirecte. Les feuillets épidermiques ont été fixés à l'acétone puis réhydratés dans le PBS.

Les tissus marqués simultanément par des anticorps de souris anti-Thy 1.2+ dilués au 1:100 pendant 16 h à 4° C. Les échantillons de tissus ont été lavés trois fois dans du PBS pendant 60 mn puis incubés 60 mn à 37° C, soit avec des anticorps de chèvre anti-souris couplés à la rhodamine, dilués au 1:20, soit avec des anticorps de chèvre anti-lapin couplés à la fluorescéine (fluorescine diluée au 1:20 dans le PBS. Les tissus ont ensuite été lavés dans le PBS avant d'être montés comme décrit précédemment).

Les témoins comportaient des feuillets épidermiques non marqués à l'anticorps primaire et incubés uniquement en présence des réactifs secondaires, afin de mettre en évidence d'éventuelles réactions croisées avec les anticorps conjugués à la rhodamine et à la fluorescéine.

Le nombre de cellules de Langerhans Ia+ ou de CED Thy 1.2+ par millimètre carré a été déterminé dans quatre zones périphériques de même surface pour chaque feuillet épidermique, par immunofluorescence, au microscope confocal Zeiss équipé à cet effet. Au moins quatre animaux ont été étudiés dans chacun des groupes. La densité de cellules de Langerhans Ia+ et de CED Thy 1.2 + est indiquée pour chaque mesure.

3 - Résultats

Les résultats résumés dans le tableau I montrent que ETF et ses homologues, administrés par voie topique à des souris C 57 BL/6 augmentent de façon hautement significative, l'activité des cellules résidentes du système immunitaire cutané.

On observe notamment une augmentation significative des phénotypes des cellules dendritiques épidermiques de Langerhans Ia+ - (HLADR) à des doses de 0,1 à 1 nanogrammes.

Parallèlement, on observe également une augmentation significative de l'activité des thymocytes épidermiques de phénotype Thy 1.2 +, c'est à dire ETAF dépendants, à des doses identiques.

- 5 La réponse immunitaire cutanée est sous la dépendance de l'activité des Kératinocytes nucléés qui secrètent l'ETAF et les médiateurs de l'immunité, c'est à dire le 2ème signal sans lequel il n'y a pas de fonction immunitaire physiologique normale (Immuno-dermatologie L.D.H.). On peut considérer que l'ETF et ses homologues, rétablissent les fonctions
- 10 basales de façon physiologique, par opposition à la stimulation antigénique exogène.

Résultats exprimés sur 4 lots de 4 souris C 57 BL/6													
Nombre de cellules Thy 1,2+ et la+ par mm2 d'épiderme													
Echantillons	Doses Nanog.	Cellules Thy 1,2+				Moyenne	%	Cellules la+				Moyenne	%
		1	2	3	4			T	1	2	3		
Témoins PC													
		80	76	87	110	88,25		98	102	100	110	102,50	
ETF-I	0,10	197	180	192	207	194,00	120	368	388	378	395	382,25	273
	0,50	200	208	199	219	206,50	134	360	392	386	399	384,25	275
	1,00	214	210	208	226	214,50	143	372	410	390	412	396,00	286
ETF-III	0,10	168	165	180	176	172,25	95	376	382	387	399	386,00	277
	0,50	190	190	205	200	196,25	122	380	388	299	388	363,75	255
	1,00	200	220	216	210	211,50	140	305	400	398	410	378,25	269
ETF-XV	0,10	160	158	160	170	162,00	84	315	326	320	330	322,75	215
	0,50	176	168	170	186	175,00	98	305	345	330	345	331,25	223
	1,00	198	180	188	199	191,25	117	348	360	348	350	351,50	243
ETF-XIX	0,10	216	210	219	212	214,25	143	360	390	378	320	362,00	253
	0,50	220	215	228	216	219,75	149	388	398	386	400	393,00	283
	1,00	227	238	230	225	230,00	161	400	410	438	415	415,75	306

EXEMPLE 5 - MESURE DE L'ACTIVITÉ ETF N° IX SUR LES KÉRATINOCYTES DE PEAU HUMAINE ISSUS DE PRIMOCULTURE

I Matériel et Méthode

5

1 - Modèle Cellulaire

Culture des Kératinocytes humains normaux

10

- Sources : Plastie mammaire

- Primoculture : Les tissus fraîchement biopsiés, en asepsie totale, sont digérés à + 4° C dans la trypsine 0,25%, afin de séparer l'épiderme du derme.

15

L'épiderme est ensuite dissocié sous action mécanique douce ou enzymatique afin d'obtenir des cellules individualisées. Seules les cellules basales seront capables de se multiplier in vitro.

La culture est réalisée en atmosphère humide contrôlée (95% O₂ - 5% CO₂) à 37° C.

20

En culture monocouche, la concentration en calcium se situe entre 0,05 et 0,1 mM. Dans ces conditions, les Kératinocytes prolifèrent rapidement mais ne forment pas de strates. La synthèse des kératinocytes est maintenue. Les espaces intercellulaires sont larges : les connections cellulaires sont assurées par les microvillosités et non par les tight-junctions. Les tonofilaments de l'espace périnucléaire sont visibles mais ils ne sont pas encore rattachés aux plaques d'encrage.

25

La stratification peut être induite par une augmentation de la concentration finale en calcium dans le milieu de culture jusqu'à 1,2 mM. Alors la formation de desmosomes apparaît au bout de 2 heures.

30

Le taux de sodium et de potassium intracellulaire augmente dès la 12ème heure, de plus, il n'est pas bloqué par les inhibiteurs classiques du flux Ca²⁺/Na⁺.

La stratification verticale est visible au bout de 2 jours et la différenciation terminale s'achève par des cellules à enveloppe cornifiée.

(Hennings et coll. 1980).

5

2 - Echantillons analysés

- I - Dérivé ETF n° IX, lyophilisé-dans Dextran (40g/l) 10^{-6} M dans milieu de culture final.
- 10 II - Thymopoïétine Crist. SIGMA - 10^6 M dans milieu de culture final.
- III - Témoin : Dextran 15.000 D - (40g/l).
- IV - Protéines cellulaires - Sol. de broyat cellulaire de référence à 50 microgrammes par ml.

15 3 - Méthodologie

La culture de kératinocytes humains est réalisée comme décrit par Henning et coll (1983) ou Fuchs et coll (1981). On effectue également des cultures air-liquide selon la méthodologie suivante.

20

- Lattices de collagène sur grille

Du collagène de type I ou IV est incorporé au milieu de culture.

Des fibroblastes 3T3 sont ajoutés à cette solution à la concentration de $1,5 \cdot 10^5$ /ml etensemencés en boîte de pétri de 35 mm qui sont ensuite

25

placées à 37° C.

Après la formation du gel, du milieu est rajouté de façon à recouvrir entièrement les lattices. Les kératinocytes sontensemencés et maintenus ainsi en culture immergée durant 7 jours.

A ce stade les lattices sont transférées sur des grilles en acier inoxydable. Ces grilles sont placées dans des boîtes contenant du milieu pendant 7 à 24 jours.

30

- Membrane basale artificielle

Des cellules endothéliales de cornée de boeuf sont cultivées sur des filtres recouverts de collagène. Après stimulation avec un facteur de croissance type FGF, ces cellules sécrètent du collagène IV et de la laminine, ainsi que d'autres molécules qui se déposent sur le collagène reconstituant ainsi une pseudo-membrane basale.

Après élimination des cellules endothéliales bovines, les kératinocytes sontensemencés sur ce support.

10 - Derme artificiel

Des fibroblastes sont incorporés dans un gel de collagène. Après rétraction du gel, les kératinocytes sontensemencés sur cette lattice.

- Membrane basale du derme

15 Des fragments de peau humaine sont désépidermisés par immersion pendant 5 jours dans du PBS à 37° C. Après un tel traitement l'épiderme se détache complètement au dessus de la membrane basale. Des congélations et décongélations successives vont tuer les fibroblastes. Ce tissu, comportant le derme et la basale, servira de couche nourricière pour les

20 kératinocytes.

Culture sur :		Kératohyaline	Kératine 67 kD
25	1. Plastique + immersion	-	-
	2. Filtre couvert de coll. I ou IV	I E	- -
30	3. Filtre couvert de mem-brane basale artificielle	I E	- -
	4. Derme artificiel	I E	± +
	5. Derme naturel désépider-misé et tué	I E	± ++

I = Immergé

E = Emergé

Le contrôle de différenciation de l'épiderme est effectué par microscopie électronique (Prunieras, 1988), par analyse biochimique (Tinois et coll, 1993) et par analyse immunologique (Woodcock et coll, 1982, Prunieras, 1988). Cette dernière peut mettre en jeu des anticorps anti-involucrine, anti-transglutaminase épidermique, anti-filaggrine et anti-kératines (AE1, AE2, AE3).

Les kératines 48 Kd sont les marqueurs de la prolifération.

Les kératines 50 et 58 Kd sont les marqueurs permanents des kératines.

Les kératines 56,5 et 65/67 Kd sont les marqueurs de la différenciation.

Les marqueurs cellulaires choisis sont les Kératines de bas poids moléculaire 46/47 KD spécifiques de la croissance des cellules germinatives et de leur différenciation cellulaire.

Les filaggrines marqueurs de la Kératohyaline.

Marquage fluorescent indirect selon la technique de sandwich - 48 heures après l'apport de calcium au milieu de culture (stratification).

I - Anticorps primaires "SIGMA"

- Ac de rat antikératine humaine 46-47 KD.
- Ac humain antikératine humaine 56,5/68 KD
- Ac humain antikératohyaline (Filaggrine)

II - Anticorps secondaires "SIGMA"

- Ac de souris anti Ig G2 de rat marqués FITC.
- Ac de chèvre anti Ig G humaine marqué FITC.

* *Dosages microscopiques*

- "Microscope ZEISS Confocal Laser Scanner"
- Epi-fluorescent - LSM 310
- Mesure des marqueurs cellulaires par immunofluorescence, avec enregistrement graphique.

* *Dosages spectrofluorimétriques*

- "Spectrofluorimètre Perkin Elmer LS - 50 B".
- Sur broyat surnageants cellulaires.

5

* *Dosages des protéines cellulaires*

- Technique de LOWRY au spectrophotomètre UV Perkin Elmer (surnageants de broyats cellulaires).

10 II Résultats

Les tableaux n° II et III résument l'activité du peptide n° IX "ETF" sur la croissance des cellules germinatives des couches basales et suprabasales de l'épiderme - "Kératinocytes jeunes".

15 L'intensité de fluorescence des cellules traitées par ETF n°IX est apprécié comparativement à l'intensité de fluorescence des témoins.

On observe une augmentation significative des cellules pré-Kératinocytaires germinatives et de leur activité métabolique. En particulier au niveau des synthèses de Kératine de bas poids moléculaire et des Kératohyalines "Filaggrines", de structures semblables à celle de la medulla du thymus.

20

Tableau II "Résumé"

Action de l'ETF sur la synthèse kératinocytaire de la kératine 46-47 KD et des protéines cellulaires comparativement à un témoin (exprimés en microgrammes/ml).

	Produit	Concentration M	Kératine /Protéine Moyenne	Kératine /Protéine Ecart Type	Stimulation %
10	Thymo- poïétine	10 ⁻⁶	94,8	3,4	19
15	ETF N°-IX	10 ⁻⁶	151,5	14,9	90
		10 ⁻⁸	156,0	13,2	95
		10 ⁻¹⁰	148,9	22,9	86
		10 ⁻¹²	113,0	5,6	41

20 Tableau III "Résumé"

Action de l'ETF sur la synthèse kératinocytaire de la kératohyaline et des protéines comparativement à un témoin (exprimés en microgrammes/ml).

	Produit	Concentration M	Kératohyaline /Protéine Moyenne	Kératine /Protéine Ecart Type	Stimulation %
30	Thymo- poïétine	10 ⁻⁶	4,99	0,54	35
35	ETF N°-IX	10 ⁻⁶	5,97	0,12	62
		10 ⁻⁸	6,75	0,66	83
		10 ⁻¹⁰	5,13	0,25	39
		10 ⁻¹²	5,11	0,39	38

EXEMPLE N° 6 - ACTION DE L'ETF SUR LES GRANULOCYTES
"MONONUCLEAR PHAGOCYTE SYSTEM"

I Introduction

5

La réponse immunitaire de l'Epiderme est sous la dépendance des Kératinocytes et des cellules de Langerhans, en association avec d'autres lignées cellulaires "granulocytes-thymocytes" etc...

10 Les cellules de Langerhans sont considérablement moins compétentes pour la phagocytose que les kératinocytes, Ce qui les différencie formellement des macrophages".

Elles sont semblables, phénotypiquement et fonctionnellement des cellules "voilées" (Veiled Cells) de la lympho afférente et des cellules interdigitalisées des nodules lymphatiques.

15 L'action des cellules de Langerhans est le résultat d'une coopération cellulaire, en particulier avec les cellules granulocytaires "phagocytes" sous la dominante des kératinocytes.

20 Il était donc intéressant d'apprécier l'activité de l'ETF, sur l'activité phagocytaire des granulocytes polymorphonucléaires et des systèmes cellulaires voisins, notamment des cellules NK (ENKAF, Epidermal Cell derived Natural Killer Activating Factor).

II - Action de l'ETF sur les granulocytes sanguins

25 1) Protocole :

Des cellules polymorphonucléaires de sang périphérique humain (granulocytes neutrophiles), à une concentration de 10^6 cellules/ml, sont préincubées 20 mm à 37° C avant l'addition de luminolet de particules de
30 zymosan opsonisées par du sérum.

La chimiluminescence est mesurée toutes les 3 minutes après l'addition du dernier réactif. Les résultats représentent la moyenne de 5 mesures indépendantes pour chaque point. (Déviation standard inférieure à 5% de moyenne).

5

Deux systèmes sont utilisés :

A. L'agent inducteur est le peptide ETF n°1 présent pendant toute la durée de l'essai.

10

Des granulocytes normaux de sang périphérique humain, enrichis par sédimentation en dextrane et débarrassés des érythrocytes par lyse hypotonique. L'ETF est testé à des concentrations de 10, 1 et 0,1 µg/ml.

15 B. L'agent inducteur ETF est éliminé par lavage après préincubation et avant l'addition des réactifs chimiluminescents.

Granulocytes normaux de sang périphérique humain purifiés par décantation sur dextrane et lyse hypotonique des érythrocytes. ETF est incubé 20 mm à 37° C avec les granulocytes puis éliminés par lavage avant l'addition de zymosan opsonisé et de luminol.

2 - Résultats : (les valeurs représentent la moyenne de 5 mesures)

25 Système A

Traitement des cellules	Valeurs de chimiluminescence à : (mm)						
	3	6	9	12	15	18	21
PBS	22 966	77 598	140 423	178 951	198 063	191 781	188 531
ETF 10µg/ml	<u>79 358</u>	<u>140 100</u>	<u>170 947</u>	183 578	174 710	160 718	137 798
1µg/ml	<u>59 867</u>	<u>138 846</u>	<u>183 578</u>	207 713	203 449	188 901	168 813
0,1µg/ml	29 205	86 761	143 463	176 924	193 589	188 573	179 449

35

Système B

5	Traitement des cellules	Valeurs de chimiluminescence à : (mm)				
		6	9	12	15	18
	PBS	69 924	114 751	144 83 8	162 594	164 750
	ETF 10µg/ml	<u>103 105</u>	<u>119 677</u>	125 307	119 952	112 499
	0,1µg/ml	100 532	124 819	134 788	129 950	133 707

10

3 - Conclusions :

- 5 A. ETF a un impact considérable sur la potentialisation de la chimiluminescence dès les premiers instants, à des concentrations de 10 et 1 µg/ml.
- B. Même après lavage, ETF induit une activation significative des granulocytes à 10 et 0,1 µg/ml.

10 EXEMPLE 7 - ACTION DE L'ETF SUR LA SYNTHÈSE DU DNA

1 - Protocole - Echantillon Peptide ETF n° VII

15 Un pool de cellules spléniques de souris normales est obtenu et incubé dans des microplaques avec ETF seul à des doses croissantes. Le DNA est dosé à J1, J3, J5.

 Les résultats sont présentés sur la figure 1.

11 Conclusions

20

 L'ETF montre une réponse très nette, proportionnelle à la dose. La plus forte dose utilisée (10 µg/ml) donne la plus grande synthèse de DNA à tous les jours du contrôle avec un maximum au 3ème jour. Il faut noter, toutefois, que les valeurs de base sont supérieures au 3ème jour, la réponse
25 spécifique est peut-être en réalité plus précoce.

EXEMPLE 8 - ACTION D'ETF SUR LES CELLULES FORMANT DES PLAGES DE LYSE (PFC)

30 1 Protocole

 50 souris Balb/C recevant 5 µg d'ETF par voie s.c. 10⁸ GRM (globules rouges de mouton) dans 0,1 ml de PBS sont injectés par voie i.v. 20, 10, et 3 jours après ETF ou 2 jours auparavant. Technique PFC de Cunningham et
35 Szenberg.

II Résultats

Nombre de PFC pour 10⁶ cellules spléniques.

5	Traitement	Date d'immuno- stimulation	Nombre de PFC à			
			J+3	J+4	J+5	J+6
10	Témoins GRM	0	86	509	374	119
	ETF 5 µg s.c.	J-20	69	438	318	84
		J-10	<u>323</u>	<u>823</u>	337	104
		J-3	57	399	353	129
		J+2	119	410	336	135
15						

III Conclusions :

On observe une réponse qui présente un maximum à J + 4 avec une augmentation importante, très significative, du nombre de PFC chez les animaux ayant reçu de l'ETF 10 jours avant l'antigène.

EXEMPLE 9 - ACTION D'ETF SUR LES CELLULES NK

I Action d'ETF sur les cellules NK - voie topique

1 - Protocole général voie topique :

souris CBA/H (90 souris)

cellules cibles :

- * YAC-1 sensibles aux NK
- * P 815 non sensibles aux NK
- * ETF n° VII

Les souris reçoivent chaque jour par voie topique 15 µg d'ETF en solution dans du Propylène Glycol à 10⁻⁵ M/ml, pendant 14 jours consécutifs. Une dose identique de rappel est administrée le 18ème jour.

La mesure de l'activité lytique est faite tous les 3 jours par comptage du ⁵¹Cr libéré pour des rapports cellules effectrices : cellules cibles de 200 : 1, 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1, pendant 4 heures d'incubation.

Les résultats sur les cellules NK par voie topique sont présentés sur les figures 2 et 3.

Les résultats sont extrêmement nets. On constate, en fonction du temps, après le début du traitement par ETF, une augmentation hautement significative de l'activité NK. Cette activité qui est décelable dès le 3ème jour devient très importante au 6ème et au 9ème jour et se maintient à un niveau très élevé pendant toute la durée de l'expérimentation (21 jours).

2 - Conclusions

Aucune cytotoxicité non spécifique sur les cellules P 815 n'est décelable à aucun moment de l'expérimentation. Ceci exclut que l'administration de l'ETF conduise à l'induction de cellules de nature cytolytique non spécifique ou à l'activation polyclonale des cellules T cytolytiques.

I I Action d'ETF sur les cellules NK - In vitro

1 - Protocole de l'essai "in vitro"

Cellules spléniques normales de souris CBA. Incubateur à 37° C + CO₂ 10⁷ cellules par ml de milieu RPMI 1640 + 5% de sérum foetal de veau. Incubation avec des quantités variables de la substance à étudier. Cellules cibles YAC-1.

La mesure de la lyse est faite par comptage du ^{51}Cr libéré pour des rapports cellules effectrices/cellules cibles de 200 : 1, 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1 pendant 4 heures d'incubation.

Les résultats sont présentés sur la figure 4.

5

2 - Conclusions :

ETF stimule très fortement l'activité des cellules NK in vitro de façon proportionnelle à la dose.

10 A une concentration de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, l'activité de l'ETF est encore très supérieure à 25 $\mu\text{g/ml}$ de poly I : C.

(Activité au moins 100 fois supérieure à celle du produit de référence poly I : C, inducteur d'interféron).

15 III Action d'ETF sur les cellules NK - Voie injectable

1- Protocole général voie injectable :

Souris CBA/H de 4 à 5 mois. (140 souris)

20 cellules cibles :

*YAC-1 sensibles aux NK (lymphome induit/virus moloney)

* P 815 insensibles aux NK (DBA/2 mastocytoma)

25 La substance à tester (ETF n°VII) est injectée par voie i.p. dans 0,2 ml de PBS, 24 heures avant le test. La mesure de la lyse est faite par comptage du ^{51}Cr libéré pour des rapports cellules effectrices : cibles de 200 : 1, 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1 pendant 4 heures d'incubation.

2 - Résultats NK/voie injectable

30 Les résultats de l'activité de stimulation des cellules NK par ETF sont représentés sur la figure 5. Ils montrent une forte activation des cellules NK, très significative ($P < 0,01$), chez les animaux ayant reçu l'ETF (15 mg/i.p.) par rapport aux témoins. Pas de cytotoxicité non spécifique sur les P815.

35

Sur la figure 6, on voit que l'activation des cellules NK par ETF est due à un effet inducteur d'interféron. On observe une réduction drastique des cellules NK lors de l'administration simultanée d'anti-interféron (α -IF).

5 La cinétique de la réponse des cellules NK aux jours 1, 3 ou 8 de l'injection, par rapport à un témoin PBS, est représentée sur la figure 7. La stimulation des cellules NK par EFT est de courte durée par voie injectable.

Chez les animaux jeunes (7 à 9 mois), ETF stimule à la fois les cellules NK et pré-NK de façon identique à des doses de tilorone de 1 mg par animal.

10

LEGENDES DES FIGURESFigure 1 :

5 ETF. Synthèse du DNA

Figure 2 :

ETF. Cellules NK/voie topique

10

○-----○ traités/ETF
●-----● témoins

Figure 3 :

15

ETF. Cellules NK/voie topique

●-----● témoins
○-----○ traités

20

Figure 4 :

ETF : cellules NK 'in vitro'

Comparaison ETF 0,1 --> 100 µg/ml

25 avec Poly I : C 25 µg/ml

○-----○ Poly I : C 25 µg/ml (témoin +)
----- PBS (témoin -)
●-----● ETF 0,1 µg/ml
+-----+ ETF 1,0 µg/ml
□-----□ ETF 10,0 µg/ml
Δ-----Δ ETF 100,0 µg/ml

30

Figure 5 :

ETF. Cellules NK voie injectable

5 Figure 6 :

ETF. Cellules NK voie injectable

Rôle de l'interféron dans la stimulation des cellules NK par ETF

10

Figure 7 :

ETF. Cellules NK voie injectable

15 Cinétique de la réponse NK ETF

Test NK 1, 3 ou 8 jours après 15 µg ETF voie (i.p.)

20

25

30

BIBLIOGRAPHIE

- 5 E. TINOIS, H. DUMAS, Q. GAETANI, D. DUPONT,
X. POURADIER DUTEIL, A. ROUGIER
Nouv. Dermatol. 12 n° 7, 510, 1993.
- H. HENNING, K.A. HOLBROOK, S.H. YUSPA
The J. of Invest. Dermatol. 81 50-55, 1983.
- 10 E. FUCHS, H. GREEN
CELL, 25 617-625, 1981.
- M. PRUNIERAS
15 Méthodes in vitro en pharmaco-toxicologie, Colloque INSERM 170 67-76,
1988.
- J. WOODCOCK-MITCHELL, R. EICHNER, W.G. NELSON, T. SUN
The J. of Cell Biol., 25 580-588, 1992.
- 20

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique ou cosmétologique, caractérisée en ce qu'elle contient

- 5 (i) au moins un conjugué peptidique, qui comprend une séquence d'au moins 3 acides aminés dérivés d'une hormone thymique choisie parmi la thymuline et la thymopoïétine, les acides aminés pouvant être indépendamment sous forme D, L ou DL,

ladite séquence étant conjuguée chimiquement ou physiquement avec au moins un composé sélectionné parmi :

- 10 - les acides monocarboxyliques de formule générale



dans laquelle R représente un radical aliphatique en C₁-C₂₀, linéaire ou ramifié, éventuellement substitué, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations,

15 ainsi que les dérivés alcool ou aldéhyde ou amide des acides de formule I ;

- les acides dicarboxyliques de formule générale

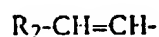


dans laquelle R₁ représente un radical aliphatique divalent, comprenant au moins 3 atomes de carbone, de préférence 3 à 10 atomes de carbone, droit ou ramifié, notamment un radical alkyl, alkylène, alkénylène ou alkynylène, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs groupes amino, hydroxy, oxo ou un radical alkyl en C₁-C₃, R₁ pouvant former un cycle avec l'une des fonctions acides

- 25 (ii) en combinaison avec un excipient pharmaceutiquement et/ou cosmétologiquement acceptable, adapté à l'administration par voie topique externe.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que dans la formule générale I, R peut représenter :

- 30 - un radical monoinsaturé de configuration cis ou trans, de formule générale



dans laquelle R₂ peut représenter un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence 6 à 16 atomes de carbone éventuellement, substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo ;

- un radical aliphatique linéaire ou ramifié en C₁-C₂₀ substitué ou non, notamment un radical alkyl, alkényl ou alkynyl pouvant comporter une ou plusieurs insaturations et pouvant être substitué par un ou plusieurs radicaux choisis dans le groupe comprenant :

- 5 NH₂, OH, oxo, thiol ou un radical cyclique non aromatique comportant de 5 à 6 atomes dans le cycle dont 1 ou 2 pouvant être différents du carbone, en particulier, S, O ou N, lesdits cycles pouvant être substitués par des radicaux alkyl en C₁ à C₃, notamment méthyl.

- 10 3. Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que dans la formule II, R₁ représente un reste alkylène en C₄-C₈ éventuellement substitué.

- 15 4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les acides de formule générale I ou II sont choisis parmi l'acide acétique et ses dérivés, l'acide pyroglutamique, l'acide DL lipoïque et ses dérivés, l'acide dihydrolipoïque et dérivés, la N-lipoyl-lysine, l'acide adipique, l'acide α-amino-adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et dérivés, les acides gras α-mono-insaturés pour
20 lesquels "R2" représente un reste alkyle, linéaire ou ramifié en C₇, en particulier les acides hydroxydécénoïques et décénoïques.

5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que les acides de formule générale I ou II sont de préférence choisis parmi
25 l'acide acétique et ses dérivés, l'acide pyroglutamique, l'acide DL-Lipoïque et ses dérivés, l'acide dihydrolipoïque, l'acide N-Lipoyl-Lysine, l'acide adipique, l'acide α-amino-adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et ses dérivés, l'acide trans-10-hydroxy-Δ²-décénoïque et l'acide trans-oxo-9-décénoïque.

30

6. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés est liée à l'acide ou au dérivé de formule I ou II, sous forme de sel, d'ester ou d'amide.

7. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le conjugué présente la formule générale



dans laquelle

5 A est un composé de formule générale I ou II ou le radical correspondant

- X est : Ser, Lys-Ser, Ala-Lys-Ser, Pyr-Ala-Lys-Ser, une liaison ou Glx-Ala-Lys-Ser

dans laquelle Glx est : Pyro-Glu, Glu ou Gly et ses dérivés

10 - Y est : Ser-Asn-OH
Ser-Asn-NH₂
Ser-OH
Ser-NH₂

les acides aminés étant sous forme D, L ou DL

15

8. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le conjugué présente la formule générale



dans laquelle

20 A est un composé de formule générale I ou II ou le radical correspondant

W représente : Glu-Gln-Arg, Gln-Arg, Arg,
Arg-Lys-, Arg-Lys-Asp ou une liaison

Z représente : Val-Tyr-NH₂, Val-Tyr-OH
Val-NH₂, Val-OH, Tyr-OH, Tyr-NH₂,

25 OH ou NH₂

l'une au moins des séquences Arg-Lys-Asp ou Lys-Asp-Val étant présente, les acides aminés étant sous forme D, L ou DL

9. Composition selon l'une des revendications 1 à 8,
30 caractérisée en ce que le conjugué est sélectionné parmi les dérivés peptidiques suivants :

- I A - Pyr - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
 II A - Pyr - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
 III A - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
 IV A - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
 5 V A - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
 VI A - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
 VII A - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
 VIII A - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
 IX A - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
 10 X A - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
 XI A-Glu-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH₂
 XII A-Glu-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH
 XIII A-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH₂
 XIV A-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH
 15 XV A-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH₂
 XVI A-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH
 XVII A-Lys-Asp-Val-Tyr-NH₂
 XVIII A-Lys-Asp-Val-Tyr-OH
 XIX A-Arg-Lys-Asp-Val-NH₂
 20 XX A-Arg-Lys-Asp-Val-OH
 XXI A-Arg-Lys-Asp-NH₂
 XXII A-Arg-Lys-Asp-OH

A étant un composé de formule I ou II, ou le radical correspondant,
 les acides aminés pouvant être sous forme D, L, ou DL

25

10. Composition selon l'une des revendications 1 à 9,
 caractérisée en ce qu'au moins une partie des acides aminés est sous forme
 glycosylée.

30

11. Composition selon l'une des revendications 1 à 10,
 caractérisée en ce qu'au moins un conjugué est sous forme de complexe
 métallopeptidique lié chimiquement ou physiquement à un sel de Zinc.

12. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'elle contient l'un des conjugués suivants :

- . acide acétique-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH₂
- . Pyr-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Ser-Asn-OH

5

13. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 12 pour la préparation d'un médicament destiné à corriger les déficiences du système immunitaire.

10

14. Utilisation d'un conjugué selon l'une des revendications 1 à 12 pour la préparation d'une composition destinée au traitement et à la prévention de la chute des cheveux.

15

15. Composition selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une préparation à usage dermatologique, utilisable sous forme de crèmes, de laits, de lotions, de sprays, en administration topique pour le traitement préventif et curatif des alopecies.

20

16. Composition selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une composition dermocosmétologique.

25

17. Composition selon l'une des revendications 1 à 12 ou 16, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une préparation dermo-cosmétologique ou cosmétique, à l'usage des soins de beauté et du rajeunissement cutané en applications locales, utilisables sous forme de crèmes, de gels, de laits, de lotions et de sprays.

30

18. Composition selon l'une des revendications 1 à 12 ou 16, caractérisée en ce qu'il s'agit de préparations cosméto-capillaires destinées à la prévention et au traitement de la chute des cheveux, applicables localement sous forme de lotions, de sprays, et d'ampoules lyophilisées, avec solvant, pour applications locales.

35

19. Conjugué peptidique susceptible d'entrer dans une composition selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'au moins 3 acides aminés dérivés de la thymuline, les acides aminés pouvant être indépendamment sous forme D, L ou DL,

ladite séquence étant conjuguée chimiquement ou physiquement avec au moins un composé sélectionné parmi :

- les acides monocarboxyliques de formule générale



dans laquelle R représente un radical aliphatique en C₁-C₂₀, linéaire ou ramifié, éventuellement substitué, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations,

ainsi que les dérivés alcool ou aldéhyde ou amide des acides de formule I ;

- les acides dicarboxyliques de formule générale



dans laquelle R₁ représente un radical aliphatique divalent, comprenant au moins 3 atomes de carbone, de préférence 3 à 10 atomes de carbone, droit ou ramifié, notamment un radical alkyl, alkylène, alkénylène ou alkynylène, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs groupes amino, hydroxy, oxo ou un radical alkyl en C₁-C₃, R₁ pouvant former un cycle avec l'une des fonctions acides.

20. Conjugué peptidique selon la revendication 19, caractérisé en ce que dans la formule générale I, R peut représenter :

- un radical monoinsaturé de configuration cis ou trans, de formule générale



dans laquelle R₂ peut représenter un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence 6 à 16 atomes de carbone éventuellement, substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo ;

- un radical aliphatique linéaire ou ramifié en C₁-C₂₀ substitué ou non, notamment un radical alkyl, alkényl ou alkynyl pouvant comporter une ou plusieurs insaturations et pouvant être substitué par un ou plusieurs radicaux choisis dans le groupe comprenant :
- 5 NH₂, OH, oxo, thiol ou un radical cyclique non aromatique comportant de 5 à 6 atomes dans le cycle dont 1 ou 2 pouvant être différents du carbone, en particulier, S, O ou N, lesdits cycles pouvant être substitués par des radicaux alkyl en C₁ à C₃, notamment méthyl,
- et dans la formule générale II, R₁ représente un reste alkylène en C₄-C₈,
- 10 éventuellement substitué.

21. Conjugué selon l'une des revendications 19 ou 20, caractérisé en ce que les acides de formule générale I ou II sont choisis parmi l'acide acétique et ses dérivés, l'acide pyroglutamique, l'acide DL
- 15 lipoïque et ses dérivés, l'acide dihydrolipoïque et dérivés, la N-lypoyl-lysine, l'acide adipique, l'acide α -amino-adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et ses dérivés, les acides gras α -mono-insaturés pour lesquels "R2" représente un reste alkyle, linéaire ou ramifié en C7, en particulier les acides hydroxydécénoïques et décénoïques, tel que l'acide
- 20 trans-10-hydroxy- Δ 2-décénoïque et l'acide trans-oxo-9-décénoïque.

22. Conjugué selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisé en ce que la séquence d'acides aminés est liée à l'acide ou au dérivé de formule I ou II, sous forme de sel, d'ester ou d'amide.

23. Conjugué selon l'une des revendications 19 à 22, caractérisé en ce qu'il présente la formule générale



dans laquelle

- 30 A est un composé de formule générale I ou II ou le radical correspondant
- X est : Ser, Lys-Ser, Ala-Lys-Ser, Pyr-Ala-Lys-Ser, une liaison ou Glx-Ala-Lys-Ser

dans laquelle Glx est : Pyro-Glu, Glu ou Gly et ses dérivés

- Y est : Ser-Asn-OH
 Ser-Asn-NH₂
 Ser-OH
 Ser-NH₂

5 les acides aminés étant sous forme D, L ou DL

24. Conjugé selon l'une des revendications 19 à 23, caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi les dérivés peptidiques suivants :

- I A - Pyr - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
- 10 II A - Pyr - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
- III A - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
- IV A - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
- V A - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
- VI A - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
- 15 VII A - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
- VIII A - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
- IX A - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂
- X A - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂
- XI A-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Ser-Asn-OH

20

A étant un composé de formule I ou II, ou le radical correspondant, les acides aminés pouvant être sous forme D, L, ou DL, une partie des acides aminés pouvant être sous forme glycosylée.

25

25. Conjugué selon l'une des revendications 19 à 24, caractérisé en ce qu'il est sous forme de complexe métallo-peptidique lié chimiquement ou physiquement à un sel de zinc.

30

26. A titre de médicament, conjugué selon l'une des revendications 19 à 25.

1 / 7

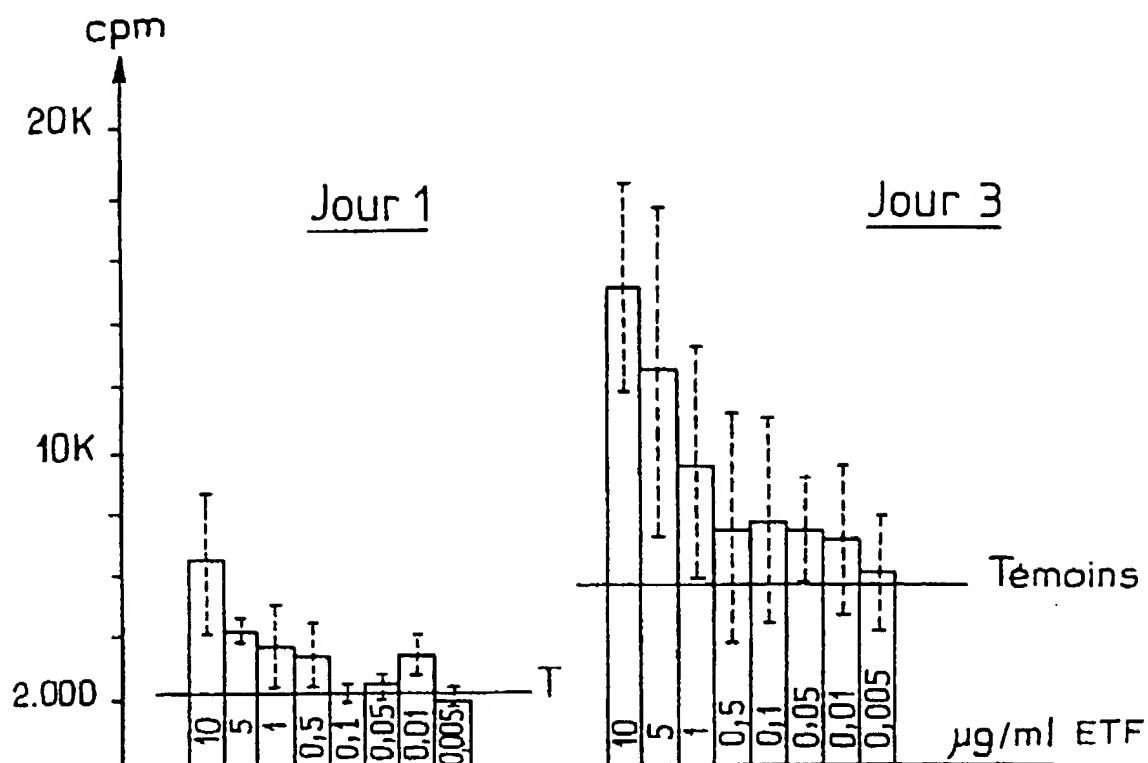


FIG. 1A

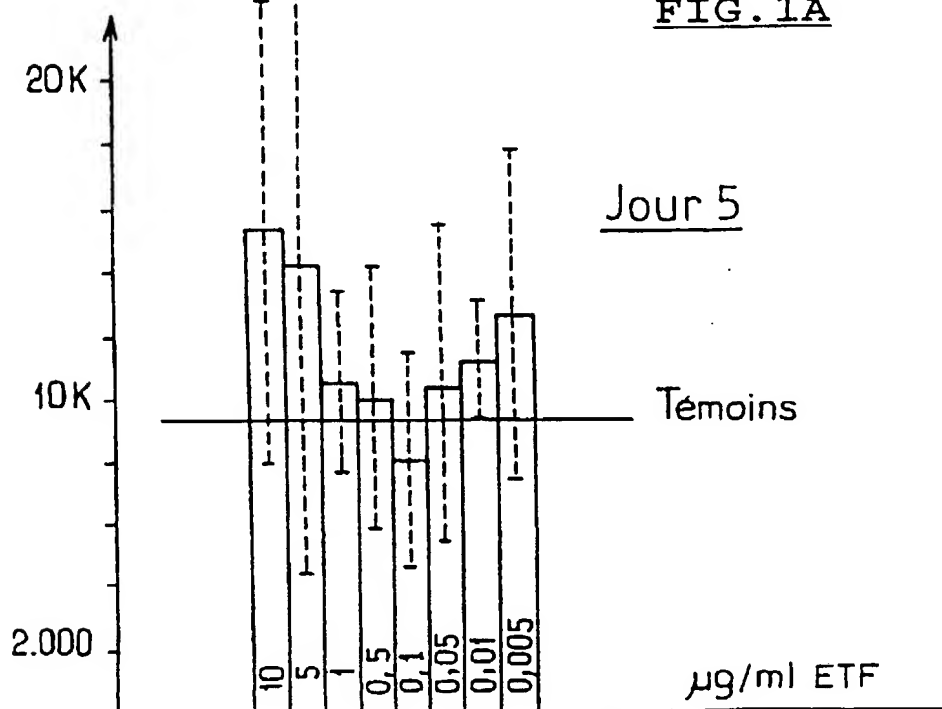


FIG. 1B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

2 / 7

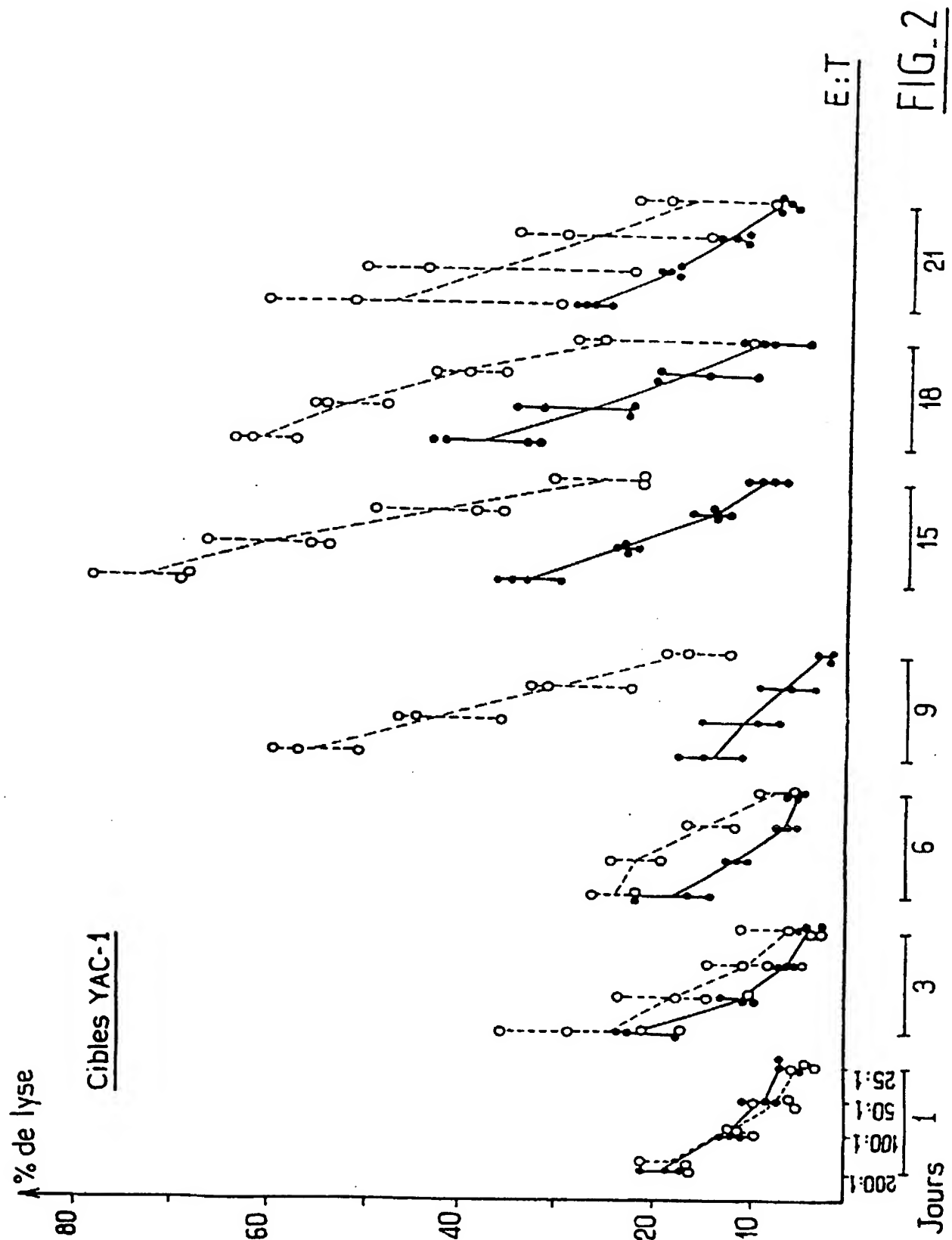
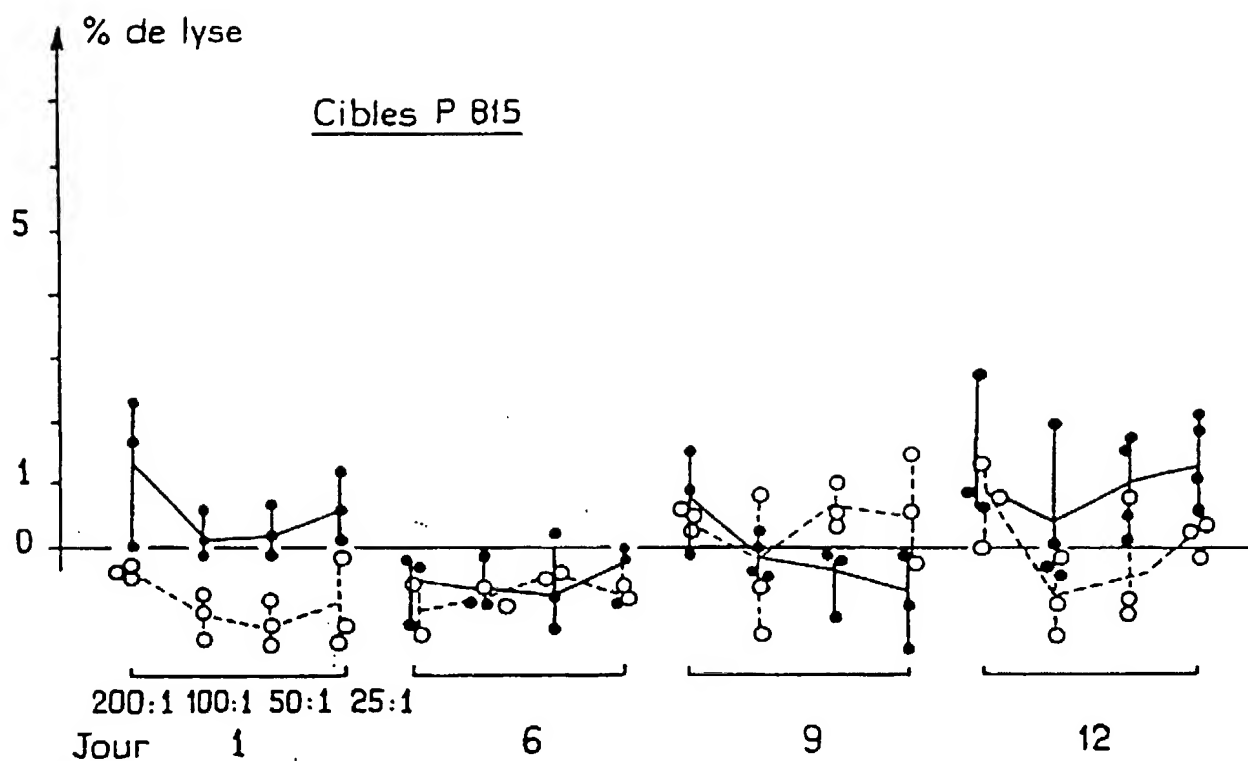
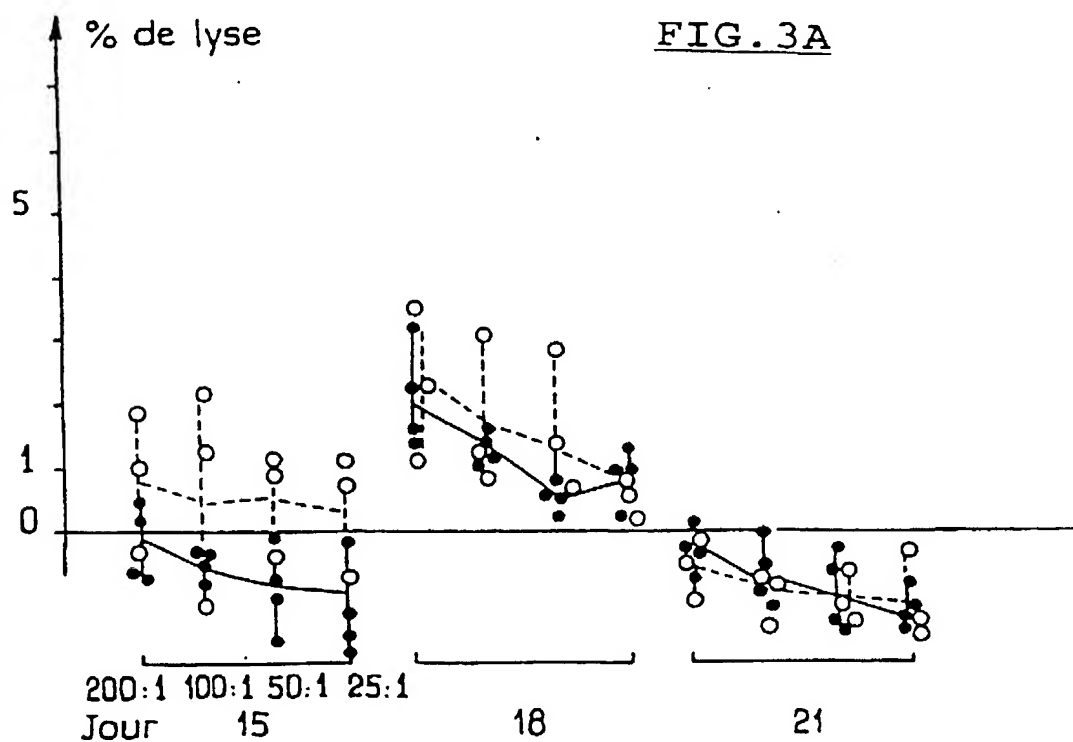


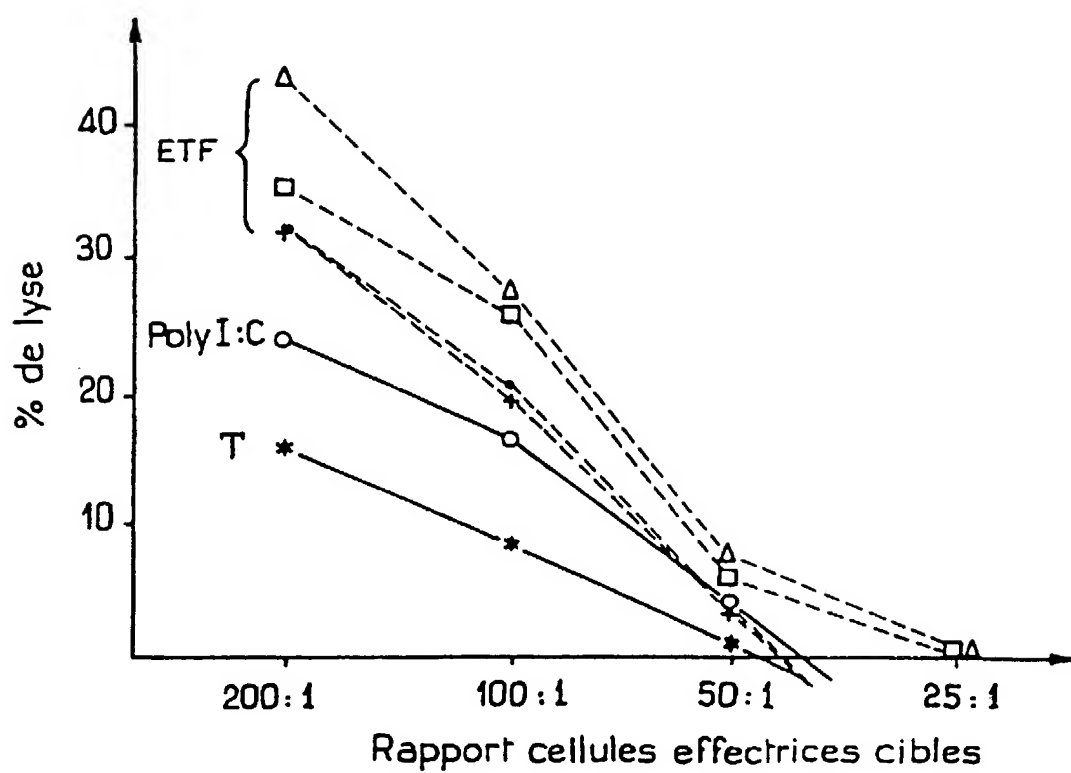
FIG. 2

3 / 7

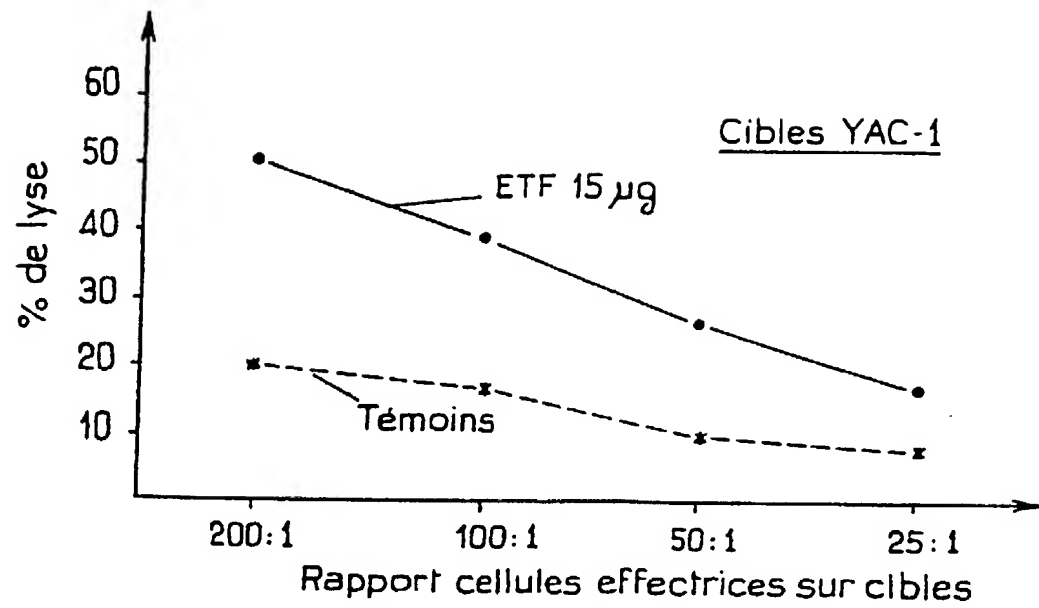
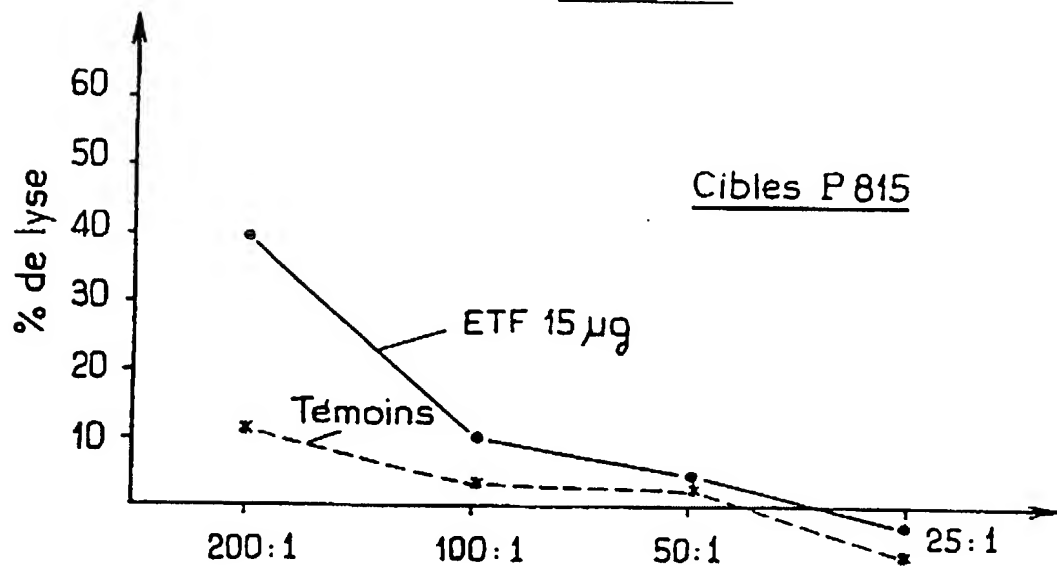
FIG. 3AFIG. 3B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

4 / 7

FIG. 4

5 / 7

FIG. 5AFIG. 5B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

6 / 7

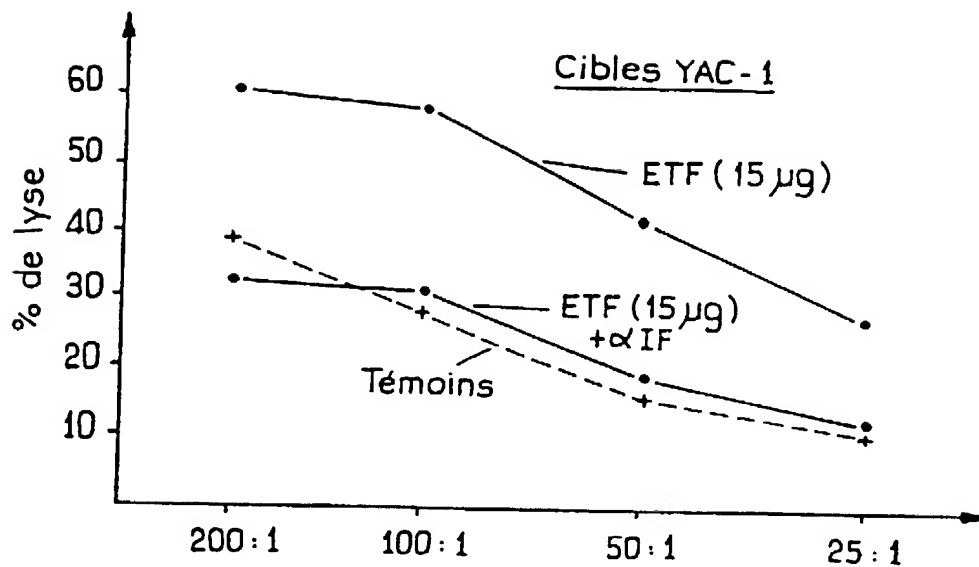


FIG. 6A

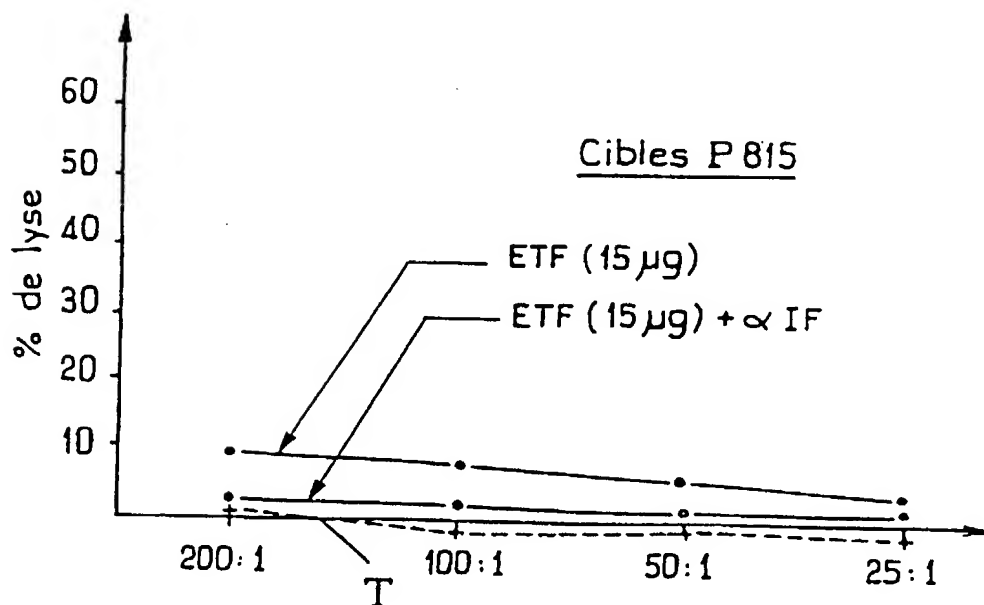
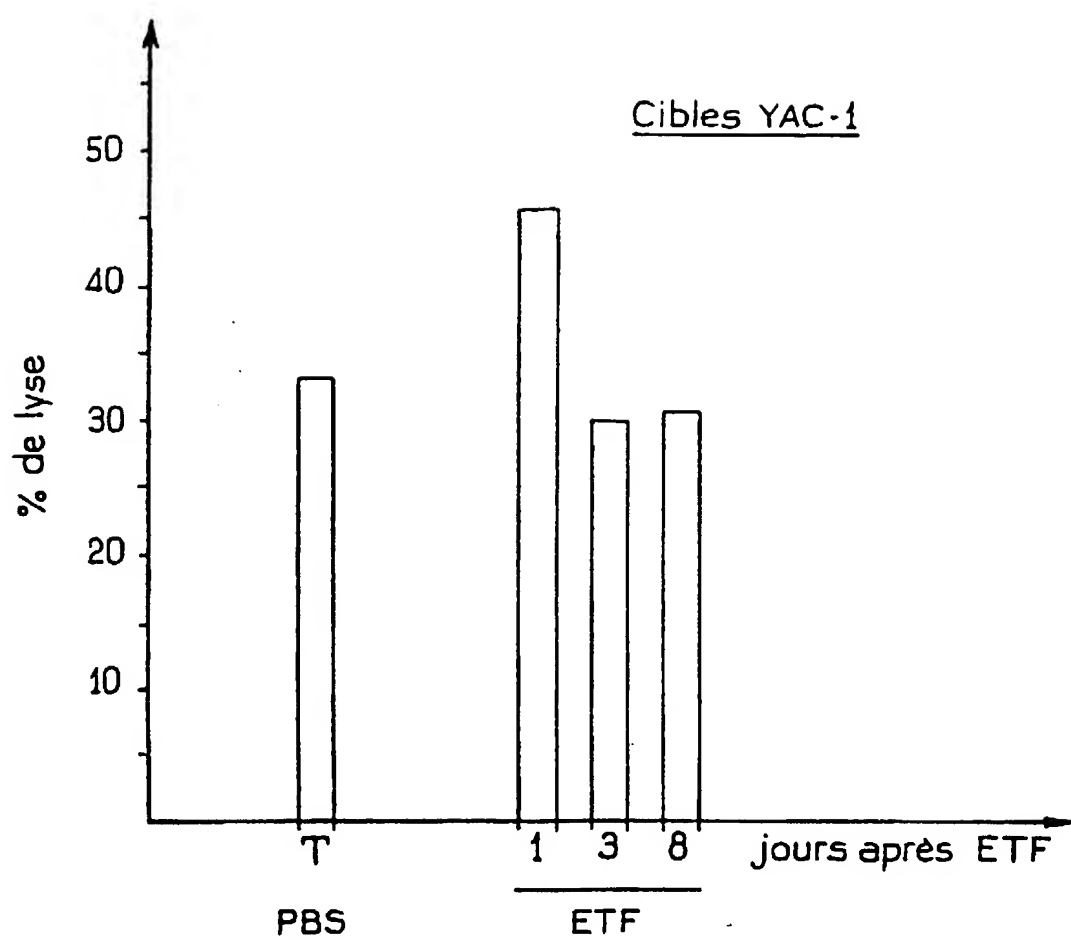


FIG. 6B

7 / 7

FIG. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/01812

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K14/66 C07K7/06 A61K38/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 1, 2 January 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 1237g, J ODARJUK ET AL.: "Histamine-releasing activity as an undesired side-effect in the development of peptide analogs" page 147; XP002010397 see abstract & CHEM. PEPT. PROTEINS, vol. 5/6 (Pt. A), 1993, pages 475-482. --- -/--	1,2,4-9, 12-26

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- * "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 March 1997

Date of mailing of the international search report

26.03.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01812

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>REGULATORY PEPTIDES, vol. 27, 1990, AMSTERDAM, THE NETHERLANDS, pages 257-262, XP000646225 G A HEAVNER ET AL.: "Peptide analogs of thymopentin distinguish distinct thymopoietin receptor specificities on two human T cell lines" see table I</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2,4-9, 12-26
X	<p>FR 2 411 174 A (ORTHO) 6 July 1979</p> <p>see examples 8,12</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2,4-9, 12-26
X	<p>EP 0 166 612 A (ORTHO) 2 January 1986</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2,4-9, 12-26
X	<p>PEPTIDES, vol. 7, no. 6, December 1986, FAYETTEVILLE, USA, pages 1015-1019, XP000646219 G A HEAVNER ET AL.: "Biologically active analogues of thymopentin with enhanced enzymatic stability" see table 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2,4-9, 12-26
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 104, no. 3, 20 January 1986 Columbus, Ohio, US; abstract no. 19826, "Peptides for radioimmunoassay of serum thymic factor" XP002027989 see abstract & JP 60 089 499 A (MITSUI PHARMACEUTICALS) 20 May 1985</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2,4-9, 21-26

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 96/01812

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-11, 13-26
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
See supplementary sheet
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Claims subject to an incomplete search: 1-11, 13-26

Reason: Due to the extremely broad scope of claims 1 and 2, which cover all sequences having even a fortuitous similarity to the compounds of the thymopoietin and thymulin families or serum thymic factor, not excluding natural compounds (the A group, according to claim 1, may be any amino acid), a complete search was not possible for reasons of economy.

The search was thus limited to the subject matter of the application as defined ultimately by claims 5, 8 and 23 combined.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01812

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2411174 A	06-07-79	US 4232008 A AT 384812 B AT 371104 B AU 519815 B AU 4220878 A BE 872608 A CA 1120031 A CH 642058 A DE 2853002 A GB 2014581 A,B JP 54098719 A JP 63027360 B NL 7812004 A SE 444687 B SE 7812614 A SU 980615 A	04-11-80 11-01-88 10-06-83 24-12-81 14-06-79 07-06-79 16-03-82 30-03-84 13-06-79 30-08-79 03-08-79 02-06-88 12-06-79 28-04-86 09-06-79 07-12-82
EP 166612 A	02-01-86	US 4629723 A AU 592309 B AU 4421585 A CA 1269499 A DE 3586697 A DK 171238 B FI 92325 B JP 6089029 B JP 61018799 A US RE34165 E	16-12-86 11-01-90 02-01-86 22-05-90 05-11-92 05-08-96 15-07-94 09-11-94 27-01-86 19-01-93

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Deur : Internationale No
PCT/FR 96/01812

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C07K14/66 C07K7/06 A61K38/04		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C07K A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 1, 2 Janvier 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 1237g, J ODARJUK ET AL.: "Histamine-releasing activity as an undesired side-effect in the development of peptide analogs" page 147; XP002010397 voir abrégé & CHEM. PEPT. PROTEINS, vol. 5/6 (Pt. A), 1993, pages 475-482, <div style="text-align: center;">---</div> <div style="text-align: center;">-/--</div>	1,2,4-9, 12-26
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>'&' document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">20 Mars 1997</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">26.03.97</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Masturzo, P</div>

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No
PCT/FR 96/01812

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	REGULATORY PEPTIDES, vol. 27, 1990, AMSTERDAM, THE NETHERLANDS, pages 257-262, XP000646225 G A HEAVNER ET AL.: "Peptide analogs of thymopentin distinguish distinct thymopoietin receptor specificities on two human T cell lines" voir tableau I ---	1,2,4-9, 12-26
X	FR 2 411 174 A (ORTHO) 6 Juillet 1979 voir exemples 8,12 ---	1,2,4-9, 12-26
X	EP 0 166 612 A (ORTHO) 2 Janvier 1986 voir le document en entier ---	1,2,4-9, 12-26
X	PEPTIDES, vol. 7, no. 6, Décembre 1986, FAYETTEVILLE, USA, pages 1015-1019, XP000646219 G A HEAVNER ET AL.: "Biologically active analogues of thymopentin with enhanced enzymatic stability" voir tableau 1 ---	1,2,4-9, 12-26
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 104, no. 3, 20 Janvier 1986 Columbus, Ohio, US; abstract no. 19826, "Peptides for radioimmunoassay of serum thymic factor" XP002027989 voir abrégé & JP 60 089 499 A (MITSUI PHARMACEUTICALS) 20 Mai 1985 -----	1,2,4-9, 21-26

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 96/01812

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°s 1-11, 13-26 se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
* voir feuille supplémentaire *
2. ☐ Les revendications n°s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/210

Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes: 1-11,13-26

Raison: A cause de l'énorme étendue des revendications 1 et 2, qui couvrent toute séquence ayant une similarité même fortuite avec des composés des familles de la thymopoïétine et de la thymuline ou facteur thymique sérique, et qui n'excluent même pas les composés naturels comme ils se présentent (le groupe A peut être, selon la revendication 1, n'importe quel acide aminé), il s'est avéré qu'une recherche complète était impossible pour des raisons d'économie. La recherche a été donc limitée au sujet de la demande tel qu'ultérieurement défini par les revendications 5, 8 et 23 combinées.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Union Internationale No
PCT/FR 96/01812

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2411174 A	06-07-79	US 4232008 A	04-11-80
		AT 384812 B	11-01-88
		AT 371104 B	10-06-83
		AU 519815 B	24-12-81
		AU 4220878 A	14-06-79
		BE 872608 A	07-06-79
		CA 1120031 A	16-03-82
		CH 642058 A	30-03-84
		DE 2853002 A	13-06-79
		GB 2014581 A,B	30-08-79
		JP 54098719 A	03-08-79
		JP 63027360 B	02-06-88
		NL 7812004 A	12-06-79
		SE 444687 B	28-04-86
		SE 7812614 A	09-06-79
		SU 980615 A	07-12-82
EP 166612 A	02-01-86	US 4629723 A	16-12-86
		AU 592309 B	11-01-90
		AU 4421585 A	02-01-86
		CA 1269499 A	22-05-90
		DE 3586697 A	05-11-92
		DK 171238 B	05-08-96
		FI 92325 B	15-07-94
		JP 6089029 B	09-11-94
		JP 61018799 A	27-01-86
		US RE34165 E	19-01-93

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)